

RAFAEL REISER

**INDUÇÃO DE ESCARRO EM ADULTOS JOVENS HÍGIDOS
EM FLORIANÓPOLIS: TAXA DE SUCESSO E
CARACTERÍSTICAS CELULARES**

**Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, para conclusão
do Curso de Graduação em Medicina.**

**Florianópolis
Universidade Federal de Santa Catarina
2006**

RAFAEL REISER

**INDUÇÃO DE ESCARRO EM ADULTOS JOVENS HÍGIDOS
EM FLORIANÓPOLIS: TAXA DE SUCESSO E
CARACTERÍSTICAS CELULARES**

**Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, para conclusão
do Curso de Graduação em Medicina.**

Presidente do Colegiado: Prof. Dr. Maurício Pereima

Professor orientador: Prof. Dr. Emilio Pizzichini

Co-orientadora: Prof. Dra. Marcia Margaret Menezes Pizzichini

**Florianópolis
Universidade Federal de Santa Catarina**

2006

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai, Osy Reiser,
que me inspirou e me deu forças
para buscar e atingir essa vitória.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a todos os voluntários saudáveis que atenderam ao convite do NUPAIVA e dispuseram de seu tempo para participar deste estudo. Sem sua generosidade e desejo de auxiliar esta pesquisa a mesma não teria sido possível. Agradeço também a equipe de pesquisadores do NUPAIVA: enfermeiras Cristiane Cinara Rocha, Maíra Chiaradia Perraro e Nazaré Otília Nazário, a bioquímica Samira Ferreira e a técnica em laboratório Célia Tânia Zimmermann.

Aos integrantes do NUPAIVA, os professores Emilio Pizzichini e Marcia Margaret Menezes Pizzichini e aos doutores Pablo Moritz e Leila John Marques Steidle, por terem me dado a oportunidade de aprender um pouco sobre pesquisa na área médica, através de técnicas, derrubando barreiras e compartilhando a suas experiências sobre o desenvolvimento científico.

Agradeço também a minha família, meus pais Osy Reiser e Lilian Hosang por sempre terem me incentivado e me mostrado o caminho do estudo, da responsabilidade e da dedicação. E meus irmãos Christianne Reiser e Carlos Eduardo Reiser que acima de tudo foram meus amigos e companheiros fiéis, me acompanharam em todas as etapas da minha vida.

Agradeço minha grande amiga Ana Karina Silva de Lima que foi meu porto seguro durante todos esses anos de convívio. E também meus grandes amigos Rafael Gonzaga Nahoum, Wilian Maduell de Mattos, Eduardo Martins Coelho, Ana Carolina Camargo Rocha e Marcela Cardoso Siewert. Amigos estes, que estiveram ao meu lado não só no estudo, mas também nas festas, viagens, férias, brigas e decepções.

Agradeço minha dupla de internato Naiana Bittencourt de Sá, que foi perfeita nesse final de curso, companheira, amiga, parceira de trabalho e de plantão. Posso dizer que formamos uma dupla e tanto.

RESUMO

Introdução: A indução de escarro é um importante método relativamente não invasivo para avaliação da inflamação das vias aéreas.

Objetivo: Investigar a taxa de sucesso na indução do escarro e identificar a celularidade do escarro em indivíduos hígidos com idade entre 18 e 40 anos.

Método: Foi realizada uma análise descritiva transversal dos achados de 32 pacientes hígidos, com volume expiratório no primeiro segundo (VEF_1) $\geq 80\%$ do previsto, VEF_1 /capacidade vital forçada (CVF) ≥ 0.75 , concentração de metacolina para produzir uma queda do VEF_1 maior ou igual a 20% (PC_{20}) $> 8\text{mg/ml}$, não fumantes, residentes em Florianópolis. O escarro induzido (EI) foi obtido e processado de acordo com o método descrito por Pizzichini *et al.*¹ A celularidade total e diferencial está expressa em mediana e 5-95% percentil.

Resultados: Obteve-se uma amostra adequada para análise de EI em 26 (81,3%) indivíduos. A celularidade total foi de $2.7 (0.5-6) \times 10^6/\text{mg}$. A contagem diferencial demonstrou que 14 (3.5-63.2)% das células eram neutrófilos, 0 (0-1.0)% eosinófilos, 73.0 (27.6-93.3) % macrófagos e 3.0 (0.2-11.1) % linfócitos.

Conclusão: A indução do escarro em indivíduos hígidos, com idade entre 20 e 40 anos tem uma alta taxa de sucesso. O escarro induzido nesta faixa etária e em nosso meio é caracterizando por percentuais elevados de macrófagos e percentuais irrisórios de eosinófilos.

ABSTRACT

Background: Induced sputum is an important relatively non invasive way to assess airway inflammation.

Objective: To identify the success of sputum induction and the pattern of inflammatory cells in sputum from a sample of healthy adults, aged between 18 and 40 years old.

Method: A descriptive transversal analysis was performed in of 32 healthy subjects, with an $VEF_1 \geq 80\%$ predicted, an VEF_1 to vital capacity ratio (VEF_1/CVF) ≥ 0.75 , a methacholine $PC_{20} > 8\text{mg/ml}$, lifelong non smokers, living in Florianópolis. The induced sputum was obtained and processed by the method described by Pizzichini *et al.*¹ The total and differential cell count were expressed as median and 5th and 95th percentiles.

Results: An adequate sputum sample was btained from 26 (81,3%) subjects. The total cell count was $2.7 (0.5-6) \times 10^6/\text{mg}$. The differential cell count revealed that 14 (3.5-63.2)% were neutrophils, 0 (0-1.0)% eosinophils, 73.0 (27.6-93.3)% macrophages and 3 (0.2-11.1)% lymphocytes.

Conclusions: The sputum induction in healthy subjects, aged between 20 and 40 years has a high success rate and the cell counts are characterized by higher percentage of macrophages and negligible percentage of eosinophils.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BD	Broncodilatador
CTC	Contagem total de células por peso
CVF	Capacidade vital forçada
DP	Desvio padrão
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EI	Escarro induzido
ONe	Óxido nítrico exalado
PC ₂₀	Concentração de metacolina necessária para causar uma queda maior ou igual a 20% do volume expiratório no primeiro segundo basal
SSI	Solução salina isotônica
VEF ₁	Volume expiratório no primeiro segundo

SUMÁRIO

FALSA FOLHA DE ROSTO.....	i
FOLHA DE ROSTO.....	ii
DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	vii
SUMÁRIO.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Escarro induzido.....	1
1.2 Medida do óxido nítrico exalado.....	3
1.3 A análise do ar exalado condensado.....	4
1.4 Aplicabilidade do escarro induzido nas doenças das vias aéreas.....	4
1.5 Escarro induzido em indivíduos hígidos.....	5
2 OBJETIVO.....	7
2.1 Primário.....	7
2.2 Secundário.....	7
3 PARTICIPANTES E MÉTODOS.....	7
3.1 Participantes.....	8
3.2 Delineamento do estudo.....	8
3.3 Definições do estudo.....	9
3.3.1 Atopia.....	9
3.3.2 Responsividade normal das vias aéreas a metacolina.....	9
3.3.3 Sucesso na indução do escarro.....	9
3.4 Métodos.....	10
3.4.1 Questionário.....	10
3.4.2 Espirometria.....	10

3.4.3	Teste de broncoprovocação pela metacolina.....	10
3.4.4	Indução de escarro.....	11
3.4.5	Processamento do escarro.....	11
3.4.6	Análise estatística.....	12
4	RESULTADOS.....	13
5	DISCUSSÃO.....	16
6	CONCLUSÃO.....	18
REFERÊNCIAS.....		19
NORMAS ADOTADAS.....		23

1 INTRODUÇÃO

A inflamação das vias aéreas é considerada a causa primária de doenças respiratórias altamente prevalentes como a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), sendo responsável pelos sintomas, exacerbações² e possivelmente, pelo remodelamento das vias aéreas³. Por isto, a identificação de marcadores biológicos que permitam identificar precocemente o processo inflamatório poderia auxiliar na monitoração e na otimização do tratamento destas doenças o que, atualmente, é um dos principais objetivos da medicina respiratória.

A importância da inflamação das vias aéreas em condições como asma, DPOC, fibrose cística e tosse crônica passou a ser reconhecida somente após a utilização da broncofibroscopia para explorar as vias aéreas dos pacientes asmáticos a partir da década de 80. Por ser invasiva, sua utilização, na asma e na DPOC, é restrita aos pacientes com doença mais leve e estável. Contudo, é interessante assinalar que muitos dos achados inflamatórios encontrados nestas formas leves de asma foram similares aqueles encontrados nos eventos terminais da doença⁴.

Atualmente o estudo da inflamação das vias aéreas na asma pode ser feito através de técnicas invasivas como a broncofibroscopia de fibra óptica para obtenção do lavado bronco-alveolar e/ou espécimes de tecido brônquico^{5,6}, ou através de técnicas menos invasivas como exame do escarro induzido^{1,7}, a medida do óxido nítrico no ar exalado (ONe) e a análise do líquido condensado do ar exalado⁸.

1.1 Escarro induzido

A indução do escarro através de um aerossol de solução salina hipertônica foi introduzida em 1958 por Bickerman *et al.*⁹ para o diagnóstico do câncer de pulmão. A técnica foi utilizada mais tarde para a investigação da tuberculose, assim como de infecções pulmonares oportunistas¹⁰.

Embora já se sabia há várias décadas que o escarro produzido espontaneamente por asmáticos contém um número aumentado de eosinófilos, e que este achado teria implicações terapêuticas, o exame do escarro foi, durante muito tempo, abandonado pela dificuldade de

obtê-lo em todos os pacientes com asma e devido às dificuldades técnicas no seu processamento que tornavam seus resultados pouco reprodutíveis. Mais recentemente dois avanços importantes permitiram a utilização disseminada do exame do escarro. Inicialmente a comprovação que o escarro poderia ser obtido em indivíduos sem escarro espontâneo. Neste sentido, a introdução da indução do escarro com o uso de solução salina em pacientes com asma de diferente gravidade,^{11,12} e em outras doenças respiratórias¹³ se tornou lugar comum entre os asmáticos. Finalmente, com o refinamento das técnicas de processamento do mesmo durante a década 90, o procedimento se tornou útil para utilização na pesquisa clínica e na prática médica devido as suas características como a exequibilidade, reprodutibilidade, validade e a responsividade às intervenções.¹⁴

Desde então se observou um crescimento rápido do número de publicações nos quais os pesquisadores têm utilizado esse método para estudar os vários aspectos da inflamação das vias aéreas. Inicialmente foi priorizado o estudo da asma. Mais recentemente o exame do escarro foi estendido para o estudo da DPOC, da fibrose cística, da tosse crônica, da fibrose pulmonar idiopática e de outras doenças respiratórias.^{13,15}

O método de indução de escarro encontra-se hoje bem validado e padronizado,¹⁶ proporcionando uma forma segura e relativamente não-invasiva de coleta de material das vias aéreas inferiores (escarro), o que pode levar à identificação de marcadores biológicos de potencial utilidade clínica na investigação das doenças inflamatórias das vias aéreas.

Este método apresenta diversas vantagens sobre os métodos invasivos de obtenção de material das vias aéreas inferiores como, por exemplo, a broncoscopia. Segurança e praticidade são as mais óbvias. Além disso, por ser relativamente não invasivo a indução de escarro pode ser realizada de forma aleatória,¹⁷ e repetidamente em indivíduos com doenças de vários graus de severidade.¹⁸

A indução do escarro consiste na inalação de um aerossol de solução salina hipertônica em diferentes concentrações em indivíduos pré-tratados com um broncodilatador de ação rápida e curta (salbutamol) para prevenir a constrição das vias aéreas.¹⁹ Este procedimento desencadeia tosse que auxilia na eliminação das secreções determinando a coleta do escarro para exame. A concentração da salina hipertônica e o tempo de indução variam de acordo com o método utilizado.¹⁶ Os riscos em pacientes com asma e DPOC que apresentam limitação ao fluxo de ar de grau leve a moderado são aceitáveis.²⁰ O método também é seguro em pacientes com limitação acentuada ao fluxo de ar, desde que a indução seja realizada com cautela e se utilize um procedimento modificado.²¹ Quando a constrição das vias aéreas ocorrer, esta pode ser rapidamente revertida através da utilização de broncodilatador de ação

rápida. Até o momento não existem relatos de efeitos adversos sérios, necessidade de admissão hospitalar ou óbito em pacientes que foram submetidos à indução de escarro para a determinar o processo inflamatório das vias aéreas.

O escarro obtido através da indução é então submetido a um processamento para que possa ser analisado. Cada passo do método utilizado para processar o escarro foi criteriosamente avaliado visando minimizar a variabilidade intrínseca do método. Por exemplo, Popov *et al.*²² propuseram um método para examinar o escarro usando citospinas (que na verdade são “imprints” de células em uma lâmina). As vantagens deste procedimento em relação ao uso do esfregaço decorrem da excelente dispersão e melhor definição das células, determinando uma maior reprodutibilidade do método e uma diminuição do tempo necessário para a contagem celular diferencial.

Um inconveniente do método decorre da necessidade de se examinar o escarro obtido seja examinado em um período de até duas horas após a sua obtenção.^{12,23} Existem alternativas que estão sendo desenvolvidas para aumentar o tempo de processamento do escarro, porém nenhuma destas é de aplicabilidade clínica imediata.²⁴

1.2 Medida do óxido nítrico exalado

Outro método não invasivo para avaliar o processo inflamatório das vias aéreas é a medida do óxido nítrico no ar exalado. Estudos com ONe mostram que ele está aumentado em asmáticos virgens de tratamento com glicocorticóide inalatório, nas exacerbações da doença e após exposição a alérgenos em pacientes suscetíveis.⁸ Contudo o aumento do óxido nítrico também pode ser observado em outras condições como nas infecções das vias aéreas superiores, ingestão de álcool, tabagismo e síndrome de Kartagener,⁸ o que torna o método bastante inespecífico.

O ONe aparentemente está associado a hiperresponsividade brônquica em adultos e crianças.⁸ Apesar de seu uso ter sido recomendado recentemente para ajustar a dose de corticosteróides inalatórios na asma de indivíduos adultos (REF), existem dúvidas de sua aplicabilidade na prática clínica, por não ser um bom método para prever a possibilidade de interrupção da corticoterapia sem deterioração do controle da asma.²⁵

1.3 A análise do ar exalado condensado

Outro método não invasivo para a avaliação da inflamação das vias aéreas. Este método permite a mensuração de diversos marcadores inflamatórios biológicos.⁸ Esse princípio já foi aplicado em adultos asmáticos, onde se encontram altas taxas de óxido nítrico, nitrito, nitrato e de peróxido de hidrogênio.²⁶ Os ensaios realizados em crianças utilizando esse método são reprodutíveis, os dados da normalidade em crianças estão disponíveis, são mais baixos que em adultos hígidos,²⁷ e que em crianças asmáticas, podendo refletir a inflamação das vias aéreas.²⁸ Contudo ainda são necessários novos avanços nessa área.

1.4 Aplicabilidade do escarro induzido nas doenças das vias aéreas

A análise do EI é importante para avaliação da inflamação das vias aéreas, provendo informações relevantes para a monitoração da asma²⁹. Observa-se que pacientes com contagem de eosinófilos no escarro inferiores a 3% não apresentam evidência de melhora clínica e funcional quando submetidos ao tratamento com corticosteróides inalatórios³⁰. Por outro lado, aqueles que apresentam bronquite eosinofílica (eosinófilos acima de 3%) apresentam melhora clínico-funcional que se correlaciona à queda dos eosinófilos no EI ou o seu desaparecimento.³¹ Isto sugere que a avaliação da inflamação subjacente é melhor do que a avaliação dos sintomas e as anormalidades funcionais para indicar o tratamento com corticosteróides. Além disto, o exame do escarro induzido pode ser útil na decisão de descontinuar o tratamento em pacientes estabilizados, indicando quais os pacientes que provavelmente irão apresentar reagudização do quadro no futuro²⁵.

O escarro induzido pode ser utilizado em outras doenças pulmonares que também possuam substrato inflamatório, como a DPOC e a bronquite eosinofílica, tosse crônica dentre outras¹³. Por outro lado, o exame do EI também é uma ferramenta útil para o diagnóstico da asma ocupacional³². Esta é uma condição cujo diagnóstico nem sempre é fácil uma vez que o teste de broncoprovocação específico com a substância suspeita de causar a asma ocupacional³³ nem sempre é possível, exigindo equipamento caro e é realizado em poucos centros especializados. Já o método alternativo de monitoração do PEF durante o trabalho e repouso é pouco sensível e específico, subestima a variação do calibre das vias aéreas e pode ter os resultados facilmente falsificados³². Por isto, o EI vêm sendo utilizado com frequência crescente uma vez que mostra um aumentado número de eosinófilos durante períodos de trabalho e se resolve após períodos de afastamento do trabalho apenas em indivíduos com

asma ocupacional³⁴,

A análise do EI também permitiu o reconhecimento da bronquite eosinofílica como uma causa tratável de tosse crônica. A maioria dos pacientes com tosse crônica tem neutrofilia no escarro³⁵. Entretanto, cerca de 40% dos portadores de tosse crônica têm contagem de eosinófilos no escarro superior a 3%¹³. Destes, metade são asmáticos e metade são na realidade portadores de uma condição específica recentemente descrita como bronquite eosinofílica¹³. Os pacientes com tosse crônica que possuem eosinofilia no escarro associada à asma e a bronquite eosinofílica respondem ao tratamento com corticosteróide. Assim, a aferição da inflamação das vias aéreas passa a ser uma importante ferramenta a ser adicionada ao algoritmo de investigação de tosse crônica³⁶.

A característica do escarro induzido nos indivíduos com DPOC é a neutrofilia¹³. Além disso a contagem absoluta e percentual dos neutrófilos correlaciona-se com a diminuição do VEF₁ e com o aumento da queda longitudinal do VEF₁, sugerindo que a inflamação neutrofílica das vias aéreas tem implicações funcionais relevantes³⁷. Alguns pacientes com DPOC apresentam uma porcentagem de eosinófilos aumentada, estes também apresentam uma resposta objetiva ao tratamento com corticosteróide³⁸.

1.5 Escarro induzido em indivíduos hígidos

A obtenção do escarro induzido em indivíduos hígidos é importante para poder utilizá-lo como uma ferramenta clínica e de pesquisa. Para isso é necessário se determinar a taxa de sucesso na obtenção do EI e os valores de referência da distribuição das células no escarro, com base em amostras de indivíduos saudáveis que representem a população geral em termos de idade e sexo.

Até o momento poucos estudos investigaram a contagem celular em indivíduos hígidos e a taxa de sucesso na obtenção do EI utilizando-se um número expressivo de participantes. Por exemplo, Belda *et al.*³⁹, examinaram 118 indivíduos hígidos com idade entre 18 e 60 anos obtendo uma taxa de sucesso de 81%. E Spanevello *et al.*⁴⁰ investigaram 114 indivíduos hígidos com idade entre 25 e 51 anos obtendo um sucesso de 85% na obtenção do EI.

Sabe-se que a celularidade do escarro pode sofrer influências regionais, conforme o nível de desenvolvimento industrial e de poluição do ar de cada cidade.⁴¹ Em um estudo realizado recentemente na cidade de Florianópolis com pacientes asmáticos, observou-se uma proporção menor de neutrófilos no escarro induzido em relação a proporção descrita em outros centros.⁴² Isto chamou atenção de que o uso de valores de referência obtidos em outros

centros poderia não ser totalmente aplicável ao nosso meio. Por causa disto, nós resolvemos determinar os valores normais para a celularidade do escarro em Florianópolis.

2 OBJETIVOS

2.1 Primário

Avaliar a taxa de sucesso na indução de escarro em adultos hígidos com idade entre 18 e 40 anos, residentes na cidade de Florianópolis há pelo menos 2 anos.

2.2 Secundário

Avaliar o perfil celular do escarro induzido nos indivíduos saudáveis incluídos nesta faixa etária.

3 PARTICIPANTES E MÉTODOS

3.1 Participantes

No presente estudo foram incluídos adultos hígidos com idade entre 20 e 40 anos, residentes em Florianópolis há mais de 2 anos, conforme Tabela 1.

Todos os indivíduos nunca haviam fumado, possuíam espirometria normal ($VEF_1 \geq 80\%$ do previsto e razão $VEF_1/CVF \geq 0,75$) e responsividade normal das vias aéreas a metacolina ($PC_{20} > 8\text{mg/ml}$).

Nenhum indivíduo apresentava história de sintomas de doenças respiratórias, não tinha sintomas de gripe ou resfriado nos últimos 30 dias, nunca foi exposto no trabalho a inalantes como poeiras e produtos químicos e não possuía história clínica de doenças crônicas.

Os pacientes que preencheram os critérios para a inclusão e não tinham critérios de exclusão foram informados quanto aos objetivos do estudo, as características dos procedimentos envolvidos e os respectivos riscos. O processamento do material obtido no exame do escarro foi realizado sem o conhecimento das características clínicas dos participantes. Após concordarem em participar, assinaram o termo de consentimento livre esclarecido. Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2 Delineamento do estudo

Este é um estudo transversal que faz parte de um projeto maior que tem como objetivo estabelecer o perfil da celularidade do escarro induzido em adultos hígidos na população de Florianópolis em diferentes faixas etárias.

O estudo consistiu de uma única visita, onde foi realizado sequencialmente, um questionário padronizado, espirometria, teste de broncoprovocação com metacolina, teste de alergia cutâneo para alérgenos inalados e indução de escarro.

3.3 Definições do estudo

3.3.1 Atopia

Presença de um ou mais halos cutâneos a alérgenos inalados com um diâmetro 2mm superior ao daquele obtido com o controle negativo⁴³.

3.3.2 Responsividade normal das vias aéreas a metacolina

Ausência de queda ou queda do VEF₁ inferior a 20% após a inalação de um aerossol de metacolina em doses crescentes até a dose de 8mg/ml, administrado durante dois minutos.⁴⁴

3.3.3 Sucesso na indução do escarro

Material expectorado com viabilidade celular $\geq 50\%$, contaminação com células escamosas $< 20\%$ e suficiente para a contagem diferencial de 400 células.

Tabela 1 – Características dos indivíduos participantes do estudo.

Características	Resultados
Participantes, n	32
Idade, anos*	25,19 (4,97)
Sexo masculino, n (%)	15 (46,9)
Atopia, n (%)	13 (40,6)
VEF₁ pré-BD *†	3,85 (0,68)
VEF₁ pré-BD, % predito *†	99,0 (10,0)
VEF₁/CVF *†	0,87 (0,06)

n = número absoluto; * Dados expressos pela média e desvio padrão (DP); % = percentual; VEF₁ = volume expiratório forçado no 1º segundo; BD = broncodilatador; CVF = capacidade vital forçada; † Valores preditos de VEF₁ segundo Crapo *et al.*⁴⁵

3.4 Métodos

3.4.1 Questionário

Foi utilizado um questionário padronizado para avaliar história de exposição ativa ou passiva ao tabagismo, história pregressa e atual de doenças respiratórias, história de infecção de vias aéreas nos últimos 30 dias (gripe ou resfriado), história de exposição ocupacional a inalantes como poeiras e produtos químicos, uso crônico de medicamentos, presença de outras doenças crônicas.

3.4.2 Espirometria

A espirometria foi realizada de acordo com as especificações da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.⁴⁶ Para tanto foi utilizado um espirômetro computadorizado (Koko[®] Spirometer, PDS Instrumentation, Louisville, EUA). Os valores preditos da normalidade são os de Crapo *et al.*⁴⁵

3.4.3 Teste de broncoprovocação pela metacolina

O teste foi realizado pelo método descrito por Juniper *et al.*⁴⁴ Após uma espirometria basal foi realizada a inalação de solução salina isotônica (SSI), durante 2 minutos, com uso de “clip” nasal, através de um nebulizador Wright (Aerosol Medical Limited; Colchester, Essex, Reino Unido), calibrado com fluxo de 0,13 ml/min. Após a inalação de SSI foram medidos três VEF₁ consecutivos aos 30, 90 e 180 segundos, respectivamente. Se o VEF₁ medido ao 180 segundos fosse menor que aos 90 segundos eram realizadas medidas adicionais a cada 2 minutos até que o valor do último VEF₁ medido fosse maior que o anterior. Se a queda do VEF₁ após a inalação de SSI fosse inferior a 20% do valor basal era iniciada a inalação de metacolina na concentração de 0,03 mg/ml, também por 2 minutos. Após a inalação da dose de metacolina foram realizados os mesmos procedimentos que se seguiram a inalação de SSI. As doses de metacolina foram administradas em doses correspondentes ao dobro da anterior até que ocorresse uma queda de 20% no VEF₁ (PC₂₀) ou até que a dose de 8mg/ml fosse administrada.

3.4.4 Indução de escarro

A indução de escarro foi realizada pelo método descrito por Pizzichini *et al.*^{1,16}, 10 minutos após a inalação de 200 µg de salbutamol, através da inalação de aerossol de concentrações progressivamente maiores de solução salina (0,9%, 3%, 4% e 5%), cada uma por 3 e 4 minutos sucessivamente, utilizando-se um nebulizador ultrasônico Fisoneb (Fisons, Pickering, Ontario, Canadá), com débito de 0,87 ml/min e partículas com diâmetro aerodinâmico de massa mediano de 5,58 µm. Após cada período de inalação o VEF₁ é medido para garantir a segurança do teste, sendo que a concentração da solução salina não é aumentada caso leve a uma queda do VEF₁ entre 10 e 19%, e a indução é interrompida caso leve a uma queda maior ou igual a 20 %, com subsequente administração de salbutamol e observação do paciente até o VEF₁ retornar aos valores próximos ao basal.

Os pacientes foram instruídos a enxaguar a boca, engolir a água e assoar o nariz para evitar contaminação com saliva ou secreção pós-nasal. A seguir foram orientados a tossir e recolher o escarro num recipiente estéril. Estes procedimentos foram consecutivamente repetidos aumentando-se a concentração da solução a cada 7 minutos de inalação do aerossol de solução salina até a obtenção de escarro suficiente para análise ou até uma queda do VEF₁ de 20% ou mais em relação ao valor basal.

3.4.5 Processamento do escarro

O escarro foi analisado dentro das primeiras 2 horas, conforme descrito por Pizzichini *et al.*¹ O escarro fresco é espalhado em uma placa de Petri, e todas as porções mais opacas ou densas, melhor visualizadas ao microscópio invertido, que pareçam diferentes de saliva são separadas e colocadas dentro de um tubo de 15 ml de poliestireno e pesadas²³. Esse material é tratado com dithiothreitol (Sputolysin 10%; Caldon Biotech Incorporation; Carlsbad, Canadá) diluído 1:10 com água destilada, em um volume 4 vezes maior do que o peso do escarro selecionado para análise. Essa mistura é turbilhonada por 15 segundos, aspirada com uma pipeta depois recolocada no tubo para garantir a mistura, depois é colocada em um homogenizador (Speci-mix; Barnstead/Thermolyne; Dubuque, Iowa, EUA) por 15 minutos. Depois é adicionado 4 vezes o volume do escarro selecionado, de salina tamponada com fosfato de Dulbecco, e recolocado no homogenizador por mais 5 minutos. A suspensão resultante é filtrada através de uma malha de nylon com 48 µm de diâmetro (BBSH; Thompson; Scarborough, Ontario) para remover debris celulares e o muco restante. A

contagem de células é realizada em um hemocitômetro Neubauer modificado e a viabilidade celular é determinada simultaneamente corando a lâmina com Trypan blue (dividindo o número de células vivas pela soma das células vivas com as mortas). O número total de células por miligrama é calculado e expresso em milhões por grama de escarro induzido selecionado. A citospina centrifugada é preparada colocando-se em média 75 μ L de suspensão de células, ajustada para obter $1,0 \times 10^6/\text{mL}$, em uma centrífuga (Cytospin 3; Life Sciences International Limited; Runcorn, Cheshire, Inglaterra) funcionando em 450 rotações por minuto durante 6 minutos. As lâminas são secas ao ar e coradas com May-Grünwalds e Giemsa, e a contagem diferencial de células é feita em 400 células não escamosas. A amostra é considerada adequada se a contagem total e diferencial de células puder ser determinada, e os resultados são expressos em milhões de células por grama de escarro.

3.4.6 Análise estatística

A sumarização dos resultados foi realizada através de uma análise descritiva dos dados. Os dados de distribuição normal foram expressos como média e DP. A contagem total de células (CTC) por peso e a viabilidade celular foram expressas como a média, mediana e 5-95% percentil. Os dados com distribuição não normal, como a contagem diferencial de células, também foram expressos como média, mediana e 5-95% percentil. A significância das diferenças entre os grupos foi estudada utilizando-se o teste t não pareado. Foram considerados significativos os valores de p inferiores a 0.05.

4 RESULTADOS

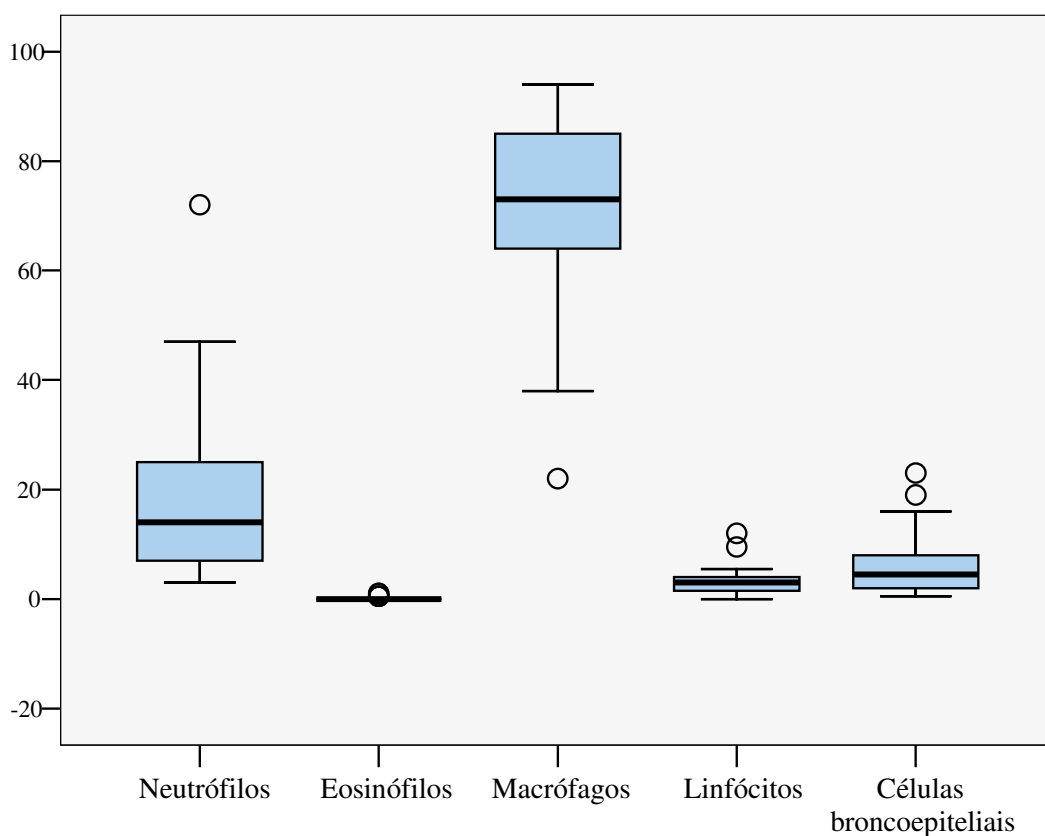
Escarro foi obtido com sucesso, após indução, em 26 indivíduos (81,3%). Houve falência do método em 6 indivíduos os quais apresentaram material insuficiente para análise (n=1) viabilidade celular inferior a 50% (n=4) ou baixa celularidade não possibilitando a contagem de 400 células (n=1). A concentração máxima de salina utilizada na indução do escarro foi de 5%, sendo que em nenhum caso houve queda maior que 10% no VEF₁ durante a indução. Nenhum participante apresentou complicações respiratórias que necessitassem de atendimento de urgência.

A CTC e a viabilidade celular foram expressos em média, mediana e 5-95% percentil, obtendo para a CTC 2,72, 2,2 (0,5 e 6) x 10⁶/mg e para a viabilidade celular 75,11, 77,0 (52,7 e 90,5)%, conforme Tabela 2. A contagem diferencial também foi expressa em média, mediana e 5-95% percentil, obtendo a contagem expressa na Tabela 2 e na Figura 1.

Tabela 2 – Características do escarro induzido de 26 indivíduos hígidos, entre 20 e 40 anos, residentes em Florianópolis.

	Média	Mediana	Percentil	
			5%	95%
Viabilidade celular %	75,1	77,0	52,7	90,5
CTC x 10⁶/mg	2,7	2,2	0,5	6,0
Neutrófilos %	19,7	14,0	3,5	63,2
Eosinófilos %	0,1	0	0	1,0
Macrófagos %	71	73,0	27,6	93,3
Linfócitos %	3,1	3,0	0,2	11,1

CTC = contagem total de células; % = percentual.



O = "outliers"; * Barras horizontais das caixas representam os percentis 25, 50 e 75%, as barras de erro representam os percentis 5 e 95%.

Figura 1 – Celularidade diferencial do escarro induzido em 26 pacientes, entre 20 e 40 anos, residentes em Florianópolis*.

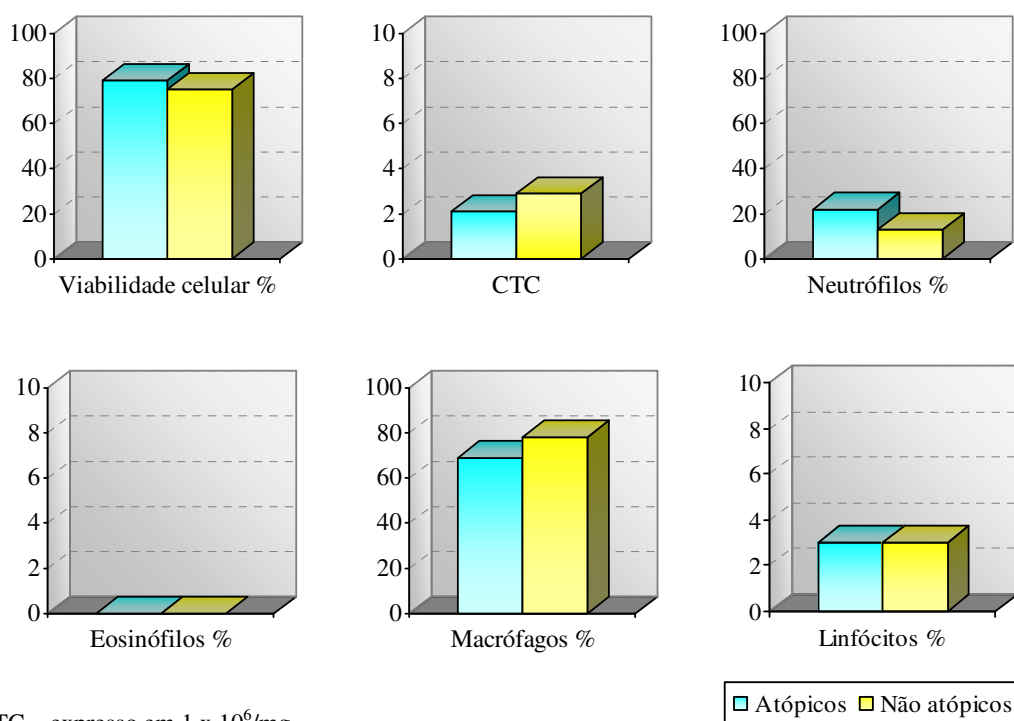
Também comparamos a celularidade entre grupos separados por sexo (dados não mostrados) e de acordo com a presença ou não de atopia. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre o percentual de células no escarro induzido entre indivíduos atópicos e não atópicos, conforme Tabela 3 e Figura 2. Não houve correlação entre a celularidade e os valores espirométricos.

Tabela 3 – Características do escarro induzido de acordo com a presença de atopia*.

	Atópicos	Não Atópicos	P
Viabilidade celular %	79,0 (16,6)	75,0 (12,1)	>0.05
CTC x 10⁶/mg	2,1 (1,6)	2,9 (3,4)	>0.05
Neutrófilos %	22,0 (28,0)	13,0 (15,0)	>0.05
Eosinófilos %	0 (0,5)	0 (0)	>0.05
Macrófagos %	69,0 (26,0)	78,0 (19,0)	>0.05
Linfócitos %	3,0 (2,5)	3,0 (3,0)	>0.05

* Resultados expressos como mediana e amplitude do interquartil.

CTC = contagem total de células; % = percentual.

**Figura 2** – Diferenças no perfil celular do escarro induzido de 26 indivíduos atópicos e não atópicos, entre 20 e 40 anos, residentes em Florianópolis.

5 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que a indução de escarro é um método exequível e bem sucedido na maioria dos indivíduos hígidos com idade entre 20 e 40 anos. Além disso, o método mostrou-se seguro, não havendo complicações.

O perfil celular observado no EI dos pacientes incluídos no estudo apresentou um baixo percentual de neutrófilos e um alto percentual de macrófagos, além de uma baixa porcentagem de eosinófilos.

O estudo realizado é o primeiro a investigar a celularidade no escarro induzido de indivíduos normais no Brasil. Nossos resultados estão validados por uma metodologia criteriosa de identificação de indivíduos hígidos e especialmente de não portadores de qualquer doença das vias aéreas. Para tanto, utilizamos, além do questionário e da espirometria, testes como a broncoprovocação por metacolina, o qual é altamente sensível para a identificação de hiperresponsividade brônquica.⁴⁷ Contudo o estudo apresentou algumas limitações como a escolha dos participantes, a qual não foi feita de forma aleatória e envolveu indivíduos principalmente do distrito sede da cidade de Florianópolis (o centro da cidade), não abrangendo a periferia da cidade. Embora os níveis de poluição entre os distritos de Florianópolis devam ser similares a amostra pode não ser representativa de toda a população da cidade.

A taxa de sucesso na obtenção do EI adequado para análise foi semelhante aos resultados publicados anteriormente por Belda *et al.*³⁹ em um estudo envolvendo 118 pacientes, entre 18 e 60 anos, com idade média de 36 anos, sendo 39% atópicos, onde se obteve sucesso na indução de escarro de 81% utilizando o método usado em nosso estudo. Spanevello *et al.*⁴⁰ também realizaram um estudo semelhante envolvendo 114 indivíduos hígidos com idade entre 25 e 51 anos, não atópicos, obtendo um sucesso na indução do escarro em 85% dos casos, o que demonstra a alta taxa de sucesso e que a indução de escarro apresenta mesmo em pacientes hígidos que não produzem escarro espontaneamente.

A contagem celular diferencial demonstrou uma concentração menor de neutrófilos e maior de macrófagos no EI do que os resultados apresentados anteriormente em indivíduos hígidos em outros estudos. Um deles publicado por Belda *et al.*³⁹ obteve uma média, mediana e 10-90% percentil de neutrófilos de 37,5, 36,7 (11,0 – 64,4)%, e de macrófagos de 58,8 e

60,0 (33,0 – 86,1)%. Spanevello *et al.*⁴⁰ obteve para os neutrófilos uma média e mediana de 27,3 e 28,5%, e para os macrófagos de 69,2 e 69,0% respectivamente.

Em outro estudo Thomas *et al.*⁴⁸ que analisaram as diferenças do perfil celular do EI de 66 hígidos, em diferentes faixas etárias, encontraram uma média e DP total de neutrófilos de 47,0 (27,0)% e de macrófagos de 49,0 (25,2)%, mas evidenciou uma maior concentração de neutrófilos e menor de macrófagos com o passar da idade, encontrando para indivíduos jovens, entre 18 e 29 anos, uma média e DP de neutrófilos de 26,9 (19,8)%, de macrófagos 65,6 (17,8)%.

Estudos publicados anteriormente também demonstraram uma maior concentração de neutrófilos relacionada ao um maior nível de poluição urbana,^{41,49} o que possivelmente também corrobora para o baixo percentual de neutrófilos encontrados no EI dos indivíduos de Florianópolis, por se tratar de uma cidade litorânea, não industrializada, com baixos níveis de poluição. Além disso é importante lembrar que, em estudo previamente realizado em Florianópolis, já se observou taxas inferiores de neutrófilos no EI,⁴² o que reforça a possibilidade de que a menor porcentagem de neutrófilos no EI ocorre devido ao baixo nível de poluição da cidade.

O baixo percentual de eosinófilos no EI foi semelhante aos encontrados em outras publicações envolvendo indivíduos hígidos.^{39,40,48} Em contraste, a taxa de linfócitos foi alta quando comparada às relatadas em outros estudos.^{39,40,48} Porém, os valores encontrados em nosso estudo são semelhantes aos reportados por in't Veen *et al.*^{50,51}. No último estudo, foram examinados onze indivíduos hígidos com idade entre 23 e 43 anos os quais tiveram um percentual médio de linfócitos de 6,0%. Estas discrepâncias entre os diversos estudos podem refletir diferenças na metodologia ou fatores ainda desconhecidos que influenciam a contagem de linfócitos em diferentes populações.

Pode ser argumentado que os resultados do presente estudo não representam de forma acurada o perfil celular de indivíduos hígidos na população com idade entre 20 e 40 anos em Florianópolis uma vez que a amostra utilizada no estudo é pequena, a forma de recrutamento não foi completamente aleatória e não abrangeu as diferentes regiões da cidade. No entanto, o este estudo é apenas parte de um projeto maior que prevê uma amostra mais significativa envolvendo diferentes faixas etárias e distritos da cidade, sendo portanto mais representativa e acurada

6 CONCLUSÃO

A indução do escarro em indivíduos hígidos, com idade entre 20 e 40 anos tem uma alta taxa de sucesso. O escarro induzido nesta faixa etária e em nosso meio é caracterizando por percentuais elevados de macrófagos e percentuais irrisórios de eosinófilos.

REFERÊNCIAS

1. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Aug;154(2 Pt 1):308-17.
2. Gibson PG, Dolovich J, Girgis-Gabardo A, Morris MM, Anderson M, Hargreave FE, et al. The inflammatory response in asthma exacerbation: changes in circulating eosinophils, basophils and their progenitors. *Clin Exp Allergy*. 1990 Nov;20(6):661-8.
3. Proceedings of a Workshop. Airway inflammation and remodeling in asthma: implications for asthma therapy. *Can Respir J*. 1996;5:15-70.
4. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso brasileiro no manejo da asma. *J Pneumol*. 1998;4:173-276.
5. Beasley R, Roche WR, Roberts JA, Holgate ST. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Mar;139(3):806-17.
6. Maestrelli P, Saetta M, Di Stefano A, Calcagni PG, Turato G, Ruggieri MP, et al. Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Dec;152(6 Pt 1):1926-31.
7. Hargreave FE. Induced sputum for the investigation of airway inflammation: evidence for its clinical application. *Can Respir J*. 1999 Mar-Apr;6(2):169-74.
8. Gibson PG, Henry RL, Thomas P. Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide, and breath condensate. *Eur Respir J*. 2000 Nov;16(5):1008-15.
9. Bickerman HA, Sproul EE, Barach AL. An aerosol method of producing bronchial secretions in human subjects: a clinical technic for the detection of lung cancer. *Dis Chest*. 1958 Apr;33(4):347-62.
10. Fishman JA, Roth RS, Zanzot E, Enos EJ, Ferraro MJ. Use of induced sputum specimens for microbiologic diagnosis of infections due to organisms other than *Pneumocystis carinii*. *J Clin Microbiol*. 1994 Jan;32(1):131-4.
11. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*. 1992 Jan;47(1):25-9.
12. Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis*. 1993 May;147(5):1126-31.

13. Pavord ID, Sterk PJ, Hargreave FE, Kips JC, Inman MD, Louis R, et al. Clinical applications of assessment of airway inflammation using induced sputum. *Eur Respir J*. 2002 Sep;37 Suppl:S40-3.
14. Hargreave FE, Pizzichini MMM, Pizzichini E. Assessment of Airway Inflammation. In: Barnes PJ, Grunstein MM, Leff AR, Woolcock AJ, editors. *Asthma*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 1433-50.
15. Birring SS, Parker D, McKenna S, Hargadon B, Brightling CE, Pavord ID, et al. Sputum eosinophilia in idiopathic pulmonary fibrosis. *Inflamm Res*. 2005 Feb;54(2):51-6.
16. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Leigh R, Djukanovic R, Sterk PJ. Safety of sputum induction. *Eur Respir J*. 2002 Sep;37 Suppl:S9-18.
17. Gibson PG, Wlodarczyk JW, Hensley MJ, Gleeson M, Henry RL, Cripps AW, et al. Epidemiological association of airway inflammation with asthma symptoms and airway hyperresponsiveness in childhood. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Jul;158(1):36-41.
18. Wong HH, Fahy JV. Safety of one method of sputum induction in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Jul;156(1):299-303.
19. Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukanovic R, Maestrelli P, et al. Sputum induction. *Eur Respir J*. 2002 Sep;37 Suppl:S3-8.
20. Vlachos-Mayer H, Leigh R, Sharon RF, Hussack P, Hargreave FE. Success and safety of sputum induction in the clinical setting. *Eur Respir J*. 2000 Nov;16(5):997-1000.
21. Pizzichini MM, Pizzichini E, Clelland L, Efthimiadis A, Mahony J, Dolovich J, et al. Sputum in severe exacerbations of asthma: kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 May;155(5):1501-8.
22. Popov T, Gottschalk R, Kolendowicz R, Dolovich J, Powers P, Hargreave FE. The evaluation of a cell dispersion method of sputum examination. *Clin Exp Allergy*. 1994 Aug;24(8):778-83.
23. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. *Eur Respir J*. 1996 Jun;9(6):1174-80.
24. Prince P, Bertrand M, Boulay ME, Bernier MC, Boulet LP. Optimization of the conditions for preservation of induced sputum: influence of freezing on cellular analysis. *Chest*. 2005 Aug;128(2):980-5.
25. Deykin A, Lazarus SC, Fahy JV, Wechsler ME, Boushey HA, Chinchilli VM, et al. Sputum eosinophil counts predict asthma control after discontinuation of inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Apr;115(4):720-7.
26. Antczak A, Nowak D, Shariati B, Krol M, Piasecka G, Kurmanowska Z. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur Respir J*. 1997 Jun;10(6):1235-41.

27. Jobsis Q, Raatgeep HC, Schellekens SL, Hop WC, Hermans PW, de Jongste JC. Hydrogen peroxide in exhaled air of healthy children: reference values. *Eur Respir J*. 1998 Aug;12(2):483-5.
28. Jobsis Q, Raatgeep HC, Hermans PW, de Jongste JC. Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. *Eur Respir J*. 1997 Mar;10(3):519-21.
29. Kim CK, Hagan JB. Sputum tests in the diagnosis and monitoring of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2004 Aug;93(2):112-22; quiz 122-4, 184.
30. Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet*. 1999 Jun 26;353(9171):2213-4.
31. Hargreave FE, Leigh R. Induced sputum, eosinophilic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Nov;160(5 Pt 2):S53-7.
32. Girard F, Chaboillez S, Cartier A, Cote J, Hargreave FE, Labrecque M, et al. An effective strategy for diagnosing occupational asthma: use of induced sputum. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Oct 15;170(8):845-50.
33. Tarlo SM, Boulet LP, Cartier A, Cockcroft D, Cote J, Hargreave FE, et al. Directives de la Societe canadienne de thoracologie pour l'asthme professionnel canadian thoracic society guidelines for occupational asthma. *Can Respir J*. 1998 Sep;5(5):397-410.
34. Lemiere C, Pizzichini MM, Balkissoon R, Clelland L, Efthimiadis A, O'Shaughnessy D, et al. Diagnosing occupational asthma: use of induced sputum. *Eur Respir J*. 1999 Mar;13(3):482-8.
35. Jatakanon A, Laloo UG, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Increased neutrophils and cytokines, TNF-alpha and IL-8, in induced sputum of non-asthmatic patients with chronic dry cough. *Thorax*. 1999 Mar;54(3):234-7.
36. Brightling CE, Ward R, Goh KL, Wardlaw AJ, Pavord ID. Eosinophilic bronchitis is an important cause of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Aug;160(2):406-10.
37. Stanescu D, Sanna A, Veriter C, Kostianev S, Calcagni PG, Fabbri LM, et al. Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax*. 1996 Mar;51(3):267-71.
38. Pizzichini E, Pizzichini MM, Gibson P, Parameswaran K, Gleich GJ, Berman L, et al. Sputum eosinophilia predicts benefit from prednisone in smokers with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Nov;158(5 Pt 1):1511-7.
39. Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Feb;161(2 Pt 1):475-8.
40. Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, Romano F, Balzano G, Migliori GB, et al. Induced sputum cellularity. Reference values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Sep;162(3 Pt 1):1172-4.

41. Nobutomo K. Air pollution and cytological changes in sputum. *Lancet*. 1978 Mar 11;1(8063):523-6.
42. Lee SVS, Pizzichini MMM, Marques LJ, Ferreira SC, Pizzichini E. Inflamação das vias aéreas em asmáticos virgens de tratamento com esteróides: características do escarro induzido. *J Pneumol*. 2003;29(4):188-95.
43. Pepys J. Skin tests in diagnosis. In: Gell PGH, Coombs RRD, Lachman PJ, editors. *Clinical aspects of immunology*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1975. p. 55-80.
44. Juniper EF, Cockcroft DW, Hargreave FE. Histamine and methacholine inhalation tests: a laboratory tidal breathing protocol. Lund: Astra Draco AB; 1991.
45. Crapo RO, Morris AH, Gardner RM. Reference spirometric values using techniques and equipment that meet ATS recommendations. *Am Rev Respir Dis*. 1981 Jun;123(6):659-64.
46. Pereira C. Diretrizes para testes de função pulmonar 2002 - Espirometria. *J Pneumol*. 2002;28 Suppl:S1-82.
47. Anderson SD, Gibson P. Use of Aerosols of Hypertonic Saline and Distilled Water. In: Barnes PJ, Grunstein MM, Leff AR, Woolcock AJ, editors. *Asthma*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 1135-49.
48. Thomas RA, Green RH, Brightling CE, Birring SS, Parker D, Wardlaw AJ, et al. The influence of age on induced sputum differential cell counts in normal subjects. *Chest*. 2004 Dec;126(6):1811-4.
49. Farone A, Huang S, Paulauskis J, Kobzik L. Airway neutrophilia and chemokine mRNA expression in sulfur dioxide-induced bronchitis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995 Mar;12(3):345-50.
50. in 't Veen JC, de Gouw HW, Smits HH, Sont JK, Hiemstra PS, Sterk PJ, et al. Repeatability of cellular and soluble markers of inflammation in induced sputum from patients with asthma. *Eur Respir J*. 1996 Dec;9(12):2441-7.
51. in 't Veen JC, Grootendorst DC, Bel EH, Smits HH, Van Der Keur M, Sterk PJ, et al. CD11b and L-selectin expression on eosinophils and neutrophils in blood and induced sputum of patients with asthma compared with normal subjects. *Clin Exp Allergy*. 1998 May;28(5):606-15.

NORMAS ADOTADAS

Este trabalho foi realizado seguindo a normatização para trabalhos de conclusão do Curso de Graduação em Medicina, aprovada em reunião do Colegiado do Curso de Graduação em Medicina da Universidade Federal de Santa Catarina, em 17 de novembro de 2005.